

EFFECTO DE LOS HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES Y *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* EN EL CONTROL DE *MELOIDOGYNE* EN PLANTAS DE TOMATE DE ÁRBOL (*SOLANUM BETACEUM*)

Orrico Guido Daniel⁽¹⁾, Ulloa Santiago Miguel⁽²⁾, Medina María Emilia⁽¹⁾

⁽¹⁾Laboratorio de Microbiología del Suelo
Centro de Investigaciones Científicas
Escuela Politécnica del Ejército
Sangolquí, Ecuador.

⁽²⁾Carrera de Ingeniería Agropecuaria
Escuela Politécnica del Ejército
Santo Domingo, Ecuador

RESUMEN

El presente trabajo se planteó con el objetivo de evaluar un método alternativo de control de nematodos agalladores de raíces (*Meloidogyne*) a través del uso de hongos micorrízicos y *Pseudomonas fluorescens*. Para la realización de este ensayo, se emplearon microorganismos aislados de cultivos orgánicos de tomate de árbol y que fueron reproducidos en condiciones de laboratorio. Se seleccionaron dos cepas de *P. fluorescens* en base a la producción de ácido cianhídrico como mecanismos de control de *Meloidogyne*. Ambas cepas fueron posteriormente inoculadas en las raíces de plantas de tomate de árbol, en forma simple y en combinación con los HMA. Se analizaron los efectos de ambos microorganismos sobre la infección de nematodos en raíces y en el desarrollo vegetal. Los resultados obtenidos comprobaron la eficacia de la co-inoculación con la cepa 1 (Z3P1) para reducir los daños producidos por el nematodo y simultáneamente, estimularon un desarrollo considerable del sistema radical y la biomasa aérea en las plantas infectadas. Además, se obtuvieron evidencias de la capacidad que poseían ambas cepas bacterianas junto con los HMA para reducir el desarrollo de los nematodos y estimular la proliferación y colonización bacteriana y micorrízica.

ABSTRACT

The present research evaluated an alternative method of biocontrol for the root-knot nematodes through the use of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and *Pseudomonas fluorescens* from the root of tree tomato. To perform this test, we used isolates organic tomato crop tree, which were subsequently reproduced in laboratory conditions. A selection was made of the most suitable strains of *P. fluorescens* for biocontrol, through biochemical tests that allowed select two hydrocyanic acid producing strains, which were then inoculated into the roots of tomato plants, separately and in combination of AMF, analyzing their effects on nematode infection in plant development and pathogen reproductive capacity in roots. The results proved the effectiveness of the co-inoculation between the strain 1 (Z3P1) and AMF to counteract the influence of the nematode and stimulate considerable development of the root system and shoot biomass in infected plants. Control evidence was obtained of the ability that both strains showed together with AMF to reduce knot formation and nematode population per gram of root, while simultaneously stimulated spore proliferation, mycorrhizal and bacterial colonization.

1 INTRODUCCIÓN

Los problemas ambientales generados por la actividad agrícola convencional han llevado a la búsqueda de nuevas tecnologías que permitan obtener los mismos resultados sin el uso de plaguicidas convencionales. Los esfuerzos por reemplazar las técnicas tradicionales de control de plagas, han impulsado a los investigadores a experimentar con organismos vivos y sus productos, como alternativas con menores consecuencias para el medio ambiente. (Atlas *et al.* 2001).

El concepto de control biológico, involucra la utilización de organismos vivos para el control de una plaga específica. El organismo control puede trabajar como un depredador, patógeno o compitiendo con el agente causante de la enfermedad. Las investigaciones desarrolladas en biocontrol, han demostrado el potencial que poseen diversos microorganismos del suelo sobre una gran cantidad de patógenos vegetales (Smith y Collins 2007). En el suelo, la región comprendida entre el sistema radicular de una planta y los microorganismos que habitan alrededor de esta, recibe el nombre de rizósfera. Su importancia para la planta radica en la variedad de interacciones ocurridas con los organismos presentes, muchas de estas funciones traen beneficios tanto para la planta como para el microorganismo involucrado. La actividad microbiana en la rizósfera, modifica constantemente las propiedades químicas del suelo, transformando los nutrientes en formas más asimilables para la planta y en otros casos, secreta sustancias que afectan el desarrollo vegetal. Estos organismos también se relacionan entre sí, a través de interacciones benéficas en unos casos, o compitiendo por los mismos recursos en otros (Atlas *et al.* 2001).

Una de estas interacciones, formada por los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) y la porción radical de más del 90% de especies vegetales, ha sido ampliamente estudiada. Esta simbiosis conocida como micorriza ha demostrado ser un fenómeno con gran potencial para la agricultura, ya que presenta beneficios nutricionales, al facilitar la absorción de nutrientes y la inducción de resistencia a enfermedades y en el aumento de la tolerancia a condiciones ambientales extremas (Smith y Read, 1997). Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) son otro grupo de microorganismos rizosféricos de gran interés para la agricultura, ya que benefician al desarrollo y nutrición vegetal, además han demostrado poseer propiedades importantes como agentes de control biológico contra muchos patógenos. El género *Pseudomonas*, es uno de los grupos de PGPR mas estudiados en la actualidad, ya que es un género ampliamente distribuido en los suelos del planeta (Mandigan, *et al.*, 2003). Dentro de las investigaciones realizadas, *Pseudomonas fluorescens* encabeza la lista de especies analizadas como agente de control biológico, debido a su capacidad para colonizar la rizósfera de un amplio rango de especies vegetales, y porque posee un metabolismo versátil, que le permite ser cultivada sin dificultades. Los ensayos que se han realizado sobre diversas cepas de esta especie para control biológico, han demostrado su eficacia contra una gran variedad de patógenos (Atlas *et al.* 2001). Una de las plagas más representativas a nivel mundial está causada por nematodos agalladores de raíces del género *Meloidogyne*. Estos parásitos habitan casi todos los suelos del planeta y afectan indistintamente alrededor del 90% de especies de interés agrícola (Siddiqi, 2000). Los ensayos realizados con PGPR, particularmente con *P. fluorescens*, al igual que con HMA, han comprobado que estos microorganismos son capaces de controlar la infección, atenuando los efectos del ataque de este nematodo en las raíces de las plantas y disminuyendo el desarrollo y reproducción de las larvas. Estos dos especies, al trabajar en conjunto, han logrado aumentar los efectos, en comparación con otras PGPR (Siddiqui y Mahmood, 2001).

Aunque se han realizado diversos estudios que comprueban la eficacia de ambos microorganismos como agentes de control contra *Meloidogyne*, no se han reportado ensayos que evalúen los efectos en tomate de árbol. La incidencia de los nematodos noduladores de raíces en el cultivo de tomate de árbol es tal, que es apremiante el desarrollo de una metodología que minimice los efectos que producen los nematodos, evitando el uso de pesticidas que han dañado la microbiota natural beneficiosa para el suelo (León, *et al.*, 2004; MAGAP, 2011).

Ante esta problemática se planteó este ensayo con el objetivo de evaluar los efectos de la inoculación combinada de HMA y *P. fluorescens* en plantas de tomate de árbol infectadas con nematodos.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Selección del material vegetal.

Las plantas de tomate de árbol de la variedad “amarilla” empleadas en el ensayo, fueron obtenidas de la empresa Agrobiotech, Sangolquí. Estas fueron germinadas *in vitro* a partir de semillas y se aclimataron a sustrato estéril.

2.2 Material biológico

Obtención del inóculo de hongos micorrícicos arbusculares

Los HMA fueron aislados a partir de muestras de suelo provenientes cultivos orgánicos de tomate de árbol. Estas muestras fueron procesadas por la técnica de tamizado húmedo propuesta por Genderman y Nicholson, citado y modificada por Herrera *et al.* (2004). En las fracciones obtenidas del procesamiento de suelo se aplicó la técnica de tamizado y centrifugación para la extracción de esporas de HMA. Las esporas aisladas fueron sembradas en las raíces de plantas recién germinadas de cebada, a razón de 20 esporas por planta, en arena de río esterilizada, en cajas Petri durante un mes. Se realizó un total de 30 cultivos, sometidos a luz solar indirecta. Posteriormente, los cultivos fueron trasladados a macetas con un sustrato estéril compuesto de tierra negra (50%), turba (25%) y cascarilla de arroz (25%), donde se sembraron semillas de cebada y se mantuvieron a temperatura ambiente con un fotoperíodo de 12 horas de luz fluorescente durante 3 meses.

Obtención del inóculo de *Pseudomonas fluorescens*

De las cepas de *P. fluorescens* previamente aisladas de la rizósfera de cultivos de tomate de árbol en el Laboratorio de Microbiología del Suelo, se seleccionaron las cepas bacterianas por la producción de ácido cianhídrico, según la técnica propuesta por Lorck (1948). La prueba realizada permitió la selección de dos cepas potencialmente aptas como agentes de control biológico contra *Meloidogyne*, a través de la producción de HCN.

Obtención de nematodos agalladores de raíces (*Meloidogyne* spp.)

Los nematodos aplicados en el ensayo fueron aislados de cultivos de tomate de árbol que presentaban los síntomas característicos de la enfermedad. Para la identificación del género *Meloidogyne*, se identificaron patrones morfológicos de macho y hembras. El aislamiento de estos microorganismos se realizó a través de la técnica de tamizado propuesta por Hooke (1970) citado por Zuckerman, *et al.* (1985). Para la posterior inoculación de este parásito, se propagó en plantas de tomate riñón var. “Sheila-Victory” cultivadas en macetas individuales, con sustrato estéril compuesto por: tierra negra (50%), turba (25%) y cascarilla de arroz (25%). Este cultivo fue mantenido por un período de 50 días para conseguir un número adecuado de parásitos para el ensayo final.

2.3 Diseño del ensayo

Se empleó un diseño completamente al azar con un arreglo factorial 2x3x2, el factor A correspondiente a la dosis esporas de HMA (M0: control con 0 esporas/g y M1 con una concentración 15 esporas/g). El factor B con las dos cepas de *Pseudomonas fluorescens* (P0: control con 0 UFC/ml, P1: Cepa 1 en una concentración de $1.5E+8$ UFC/ml y P2: cepa 2 en una concentración de $1.5E+8$ UFC/ml). El factor C que representa a la dosis de *Meloidogyne* (N0 o control con 0 juveniles/ml). Cada planta de tomate de árbol fue tomada como una unidad experimental, obteniendo en total 12 repeticiones por cada tratamiento, es decir que el ensayo estuvo constituido por un total de 144 plantas.

2.4 Montaje del ensayo final

Este ensayo tuvo una duración de 90 días a partir del transplante de plantas de tomate. Las plantas fueron mantenidas en una cámara de crecimiento, en donde se les suministró solución de Hewitt durante 30 días. El sustrato empleado estuvo compuesto de tierra negra (50%) turba (25%) y arena de río (25%), esterilizadas por medio de calor húmedo (a 120°C y 15psi durante 15 minutos). Se adicionaron 140 gramos de inóculo micorrízico con una concentración de 15 esporas por gramo. Se inocularon 20 ml de las cepas de rizobacterias 30 días después del transplante con una concentración de 1.5×10^8 células/ml. Para los tratamientos que no poseen bacterias, se aplicó con solución salina estéril al 0,85% de NaCl. Los nematodos cultivados en las plantas de tomate riñón, fueron extraídos a través de la técnica de macerado y filtrado para alcanzar una concentración aproximada de 200 nematodos/ml en agua destilada estéril, alcanzando 2000 nematodos por planta. Las plantas fueron infectadas con nematodos 60 días después del ensayo.

2.5 Evaluación de las variables

Las variables de respuesta fueron tomadas al finalizar el ensayo 90 días después de su inicio. La medición de la altura, perímetro, área foliar, peso aéreo y radical correspondieron a la evaluación del desarrollo vegetal de las plantas. El porcentaje de agallamiento fue calculado por medio de la técnica propuesta por Baker (1985) citado por Zuckerman, *et al.* (1985). Para evaluar la población de nematodos juveniles se aplicó la técnica de propuesta por Hooke (1987). En el conteo de la población bacteriana que colonizó la raíz, se aplicó la técnica de conteo en placa de las unidades formadoras de colonias (UFC). El sustrato resultante del ensayo, fue procesado por la técnica propuesta por Genderman y Nicholson, modificada por Herrera *et al.*, 2004 y a continuación se realizó la extracción de las esporas de HMA, empleando el método de tamizado y centrifugación. Para el cálculo del porcentaje de colonización se empleó la técnica propuesta por Phillips & Hayman (1970).

2.6 Análisis estadísticos

Los datos obtenidos en el desarrollo vegetal fueron analizados a través de un análisis de varianza (ANOVA) con una comparación de medias aplicando la prueba LSD de Fisher (95 % de confianza).

En la cuantificación de la población de nematodos se calcularon las siguientes variables: nematodos por gramos de raíz, población final por raíz y tasa de reproducción. Los datos fueron evaluados a través del análisis de varianza y LSD de Fisher al 95% de confianza.

La evaluación de la simbiosis micorrícica se llevó a cabo analizando el número de esporas producidas por gramo de suelo y el porcentaje de colonización. El análisis de varianza y la prueba de Tukey, fueron empleados para el análisis de los datos.

Para analizar las concentraciones bacterianas obtenidas se aplicó una prueba de Tukey al 5% y análisis de varianza.

3 RESULTADOS

3.1 Evaluación del desarrollo vegetal

La prueba LSD de Fisher mostró un desarrollo significativo en el peso radical de las plantas infectadas por nematodos que fueron inoculadas con la cepa 1 (fig. 1). El largo de raíz fue estimulado significativamente solo por la inoculación con HMA en presencia de nematodos (fig. 2). En el peso aéreo, se observó que la inoculación conjunta de *P. fluorescens* (cepa 1) y HMA produjo un desarrollo significativo de las plantas infectadas por *Meloidogyne* (fig. 3) En las plantas sanas, la cepa 2 produjo un aumento significativo sobre el peso radical al compararlos con las plantas control (libres de microorganismos) (fig. 1).

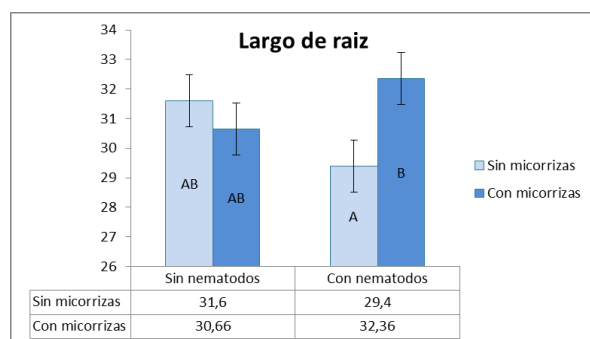


Figura 1. Efecto de la interacción de *Pseudomonas* con nematodos en el peso radical.

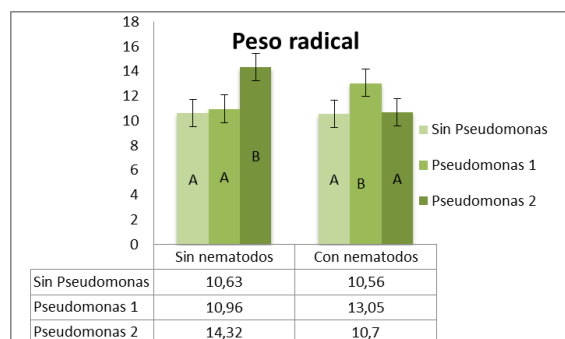


Figura 2. Efecto de la interacción micorrizas con nematodos en el largo de raíz.

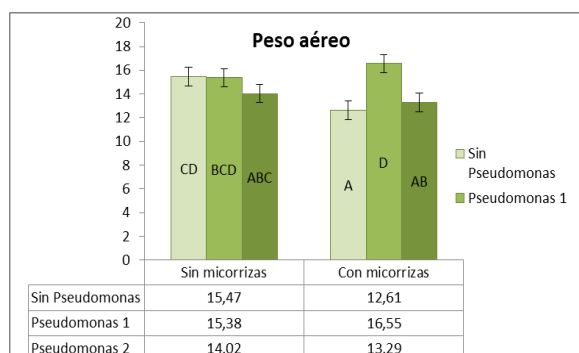


Figura 3. Efecto de la interacción de micorrizas con *Pseudomonas* en el peso aéreo.

3.2 Evaluación de la infección por Meloidogyne

Todas las plantas co-inoculadas con HMA y con las dos cepas bacterianas, desarrollaron los índices de agallamiento más bajos (fig. 4), corroborando que al igual que en el desarrollo vegetal, la inoculación conjunta atenúa los efectos producidos por los nematodos. La inoculación de HMA redujo significativamente el índice alcanzado por el tratamiento con nematodos, pero no consiguió alcanzar los niveles de la inoculación conjunta con *P.f* (fig. 4).

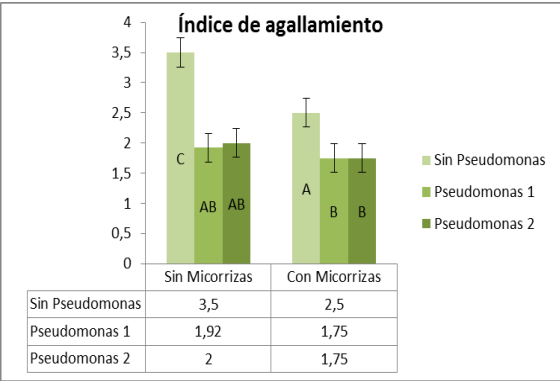


Figura 4. Efecto en el índice de agallamiento de micorrizas con *Pseudomonas*.

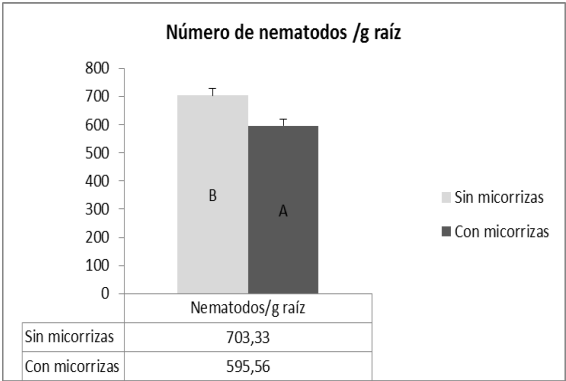


Figura 5. Efecto del factor micorrizas en el número de nematodos por gramo de raíz.

El número de nematodos calculado por gramo de raíz es una variable que disminuye con la adición de HMA. El tratamiento inoculado únicamente con nematodos presenta la mayor cantidad de estos parásitos (730/ gramo de raíz) comparándolo con los tratamientos que poseen la inoculación de micorrizas y bacterias que resultan significativamente inferiores (540/ gramo de raíz). No se observaron diferencias significativas entre tratamientos de la población final y la tasa de reproducción de *Meloidogyne*.

3.3 Evaluación de la colonización de hongos micorrícicos arbusculares

La inoculación combinada con cualquiera de las dos cepas estimuló significativamente a la esporulación de HMA, sin que la presencia de nematodos afecte a la producción de esporas micorrícicas, ya que no se observaron diferencias significativas entre tratamientos inoculados y libres de parásitos (fig. 6).

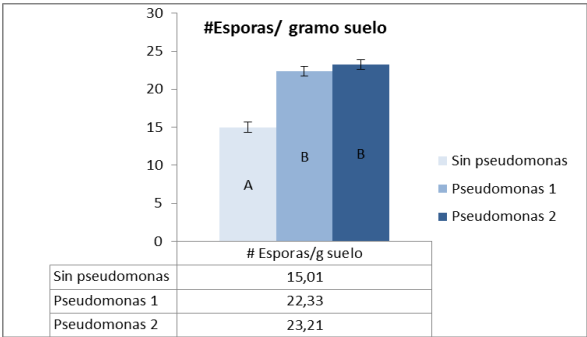


Figura 6. Efecto del factor *Pseudomonas* en el número de esporas por gramo de suelo.

Efecto de los hongos micorrícicos arbusculares y pseudomonas fluorescens 7

Los dos tratamientos que poseían la combinación de HMA con rizobacterias desarrollaron el mayor porcentaje de colonización (fig. 7) juntos fueron superiores estadísticamente a las plantas colonizadas solo con micorrizas. La combinación de HMA y *P.f.* mejora la colonización micorrícica, aunque no alcanza a contrarrestar el efecto de los nematodos, que afectan negativamente a las micorrizas, disminuyendo el porcentaje de colonización (fig. 8).

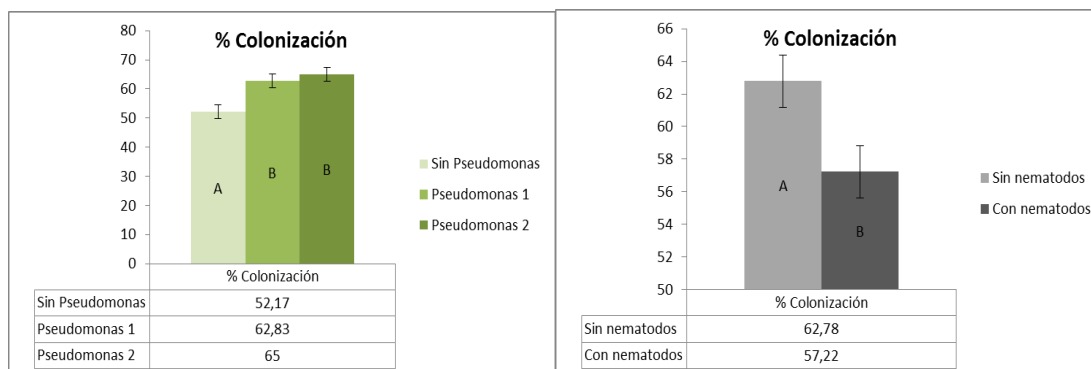


Figura 7. Efecto del factor Pseudomonas en el porcentaje de colonización de HMA.

Figura 8. Efecto del factor nematodos en el porcentaje de colonización de HMA.

3.4 Evaluación de la población de Pseudomonas fluorescens

Los análisis demostraron que tanto la inoculación de hongos micorrícicos como la presencia de nematodos produjeron diferencias significativas en la población de bacterias. Al analizar la interacción entre HMA y nematodos, se observó claramente que la presencia de los dos organismos aumentó significativamente el número de UFC (fig. 10a). La presencia de hongos micorrícicos estimuló significativamente la reproducción de la cepa 1 (fig. 10b).

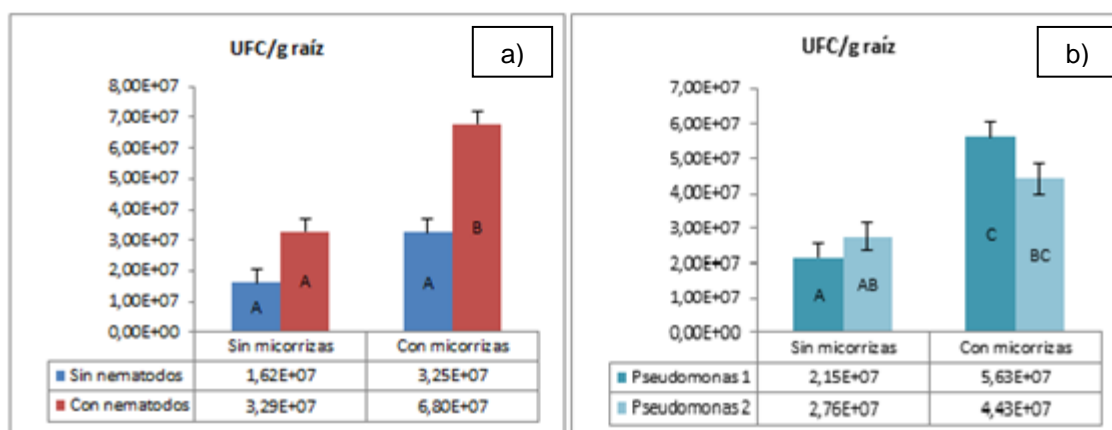


Figura 10. Efecto en el conteo de UFC por gramo de raíz de los factores: a) Micorrizas con nematodos. b) Micorrizas con Pseudomonas

4 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.

4.1 Evaluación del desarrollo vegetal de plantas de tomate de árbol (*Solanum betaceum*)

El análisis de varianza realizado en las variables de crecimiento reveló la influencia de la cepa 1 de *P. fluorescens* en el crecimiento vegetal en las plantas infectadas con *Meloidogyne*. En el peso radical, se observa la significancia que tuvo la interacción entre *Pseudomonas* y nematodos, confirmando los efectos de la cepa 1 sobre la infección de *Meloidogyne* y la influencia en el crecimiento que tuvo la cepa 2 en las plantas sanas (fig. 1). Al evaluar el peso aéreo se observa que aunque la presencia de nematodos redujo significativamente el peso aéreo de todas las plantas infectadas, la cepa 1 controló efectivamente al parásito produciendo un crecimiento considerable de la biomasa aérea (fig. 3). La interacción de HMA y *Pseudomonas* (cepa 1) demostró ser muy útil en el control de *Meloidogyne* estimulando el desarrollo aéreo en todas las plantas. Estos análisis sugieren que la cepa 1 (Z3P1) posee mayor eficacia en comparación con la cepa 2 para contrarrestar la infección por nematodos agalladores en el desarrollo vegetal, probablemente debido a que la producción del HCN podría alcanzar niveles superiores en esta cepa. El HCN es un metabolito con propiedades nematicidas, capaz de atenuar la reproducción e infección de *Meloidogyne* (Siddiqui *et al* 2005 ; Siddiqui, *et al.* 2006).

En el caso de los HMA, se observó que estos impulsaron el desarrollo de la biomasa radical tanto en plantas sanas como enfermas. En cuanto a la longitud, al analizar la interacción entre HMA y *Meloidogyne*, se observó que los hongos permiten un mejor crecimiento longitudinal de las raíces bajo los efectos de *Meloidogyne*, que aquellas libres de HMA que poseían parásitos (fig. 2).

4.2 Evaluación de la infección por *Meloidogyne*

La combinación de HMA con las cepas bacterianas redujo el índice agallamiento de forma significativa en comparación con la inoculación simple con HMA. Cabe agregar que todos los tratamientos que incluían microorganismos benéficos redujeron el índice de agallamiento de forma significativa con respecto tratamiento que solo poseía nematodos. Entre los efectos reportados de las asociaciones entre HMA y *P. fluorescens* contra nematodos agalladores, se ha observado la reducción en la capacidad reproductiva de estos parásitos, reflejada en la disminución de la cantidad de huevos producidos como en la supervivencia de los juveniles capaces de infectar las raíces debido a la producción de HCN (Siddiqui y Mahmood, 1997; Moens, *et al.*, 2001; Mahmood, *et al.*, 2011). Es probable que nuestras cepas, posean efectos tóxicos producidos por el mismo metabolito, que disminuyeron la población de nematodos por gramo de raíz. La presencia de ambos microorganismos benéficos estimula el desarrollo radical y al mismo tiempo reduce el número de nematodos. Si bien este efecto se puede observar en los tratamientos que solo llevan la inoculación simple de cada microorganismo es mayor en los tratamientos co-inoculados.

4.3 Evaluación de la colonización de hongos micorrícicos

La colonización micorrícica al igual que en la producción de esporas, fue estimulada por la presencia de *Pseudomonas*, ambas cepas influenciaron en todos los tratamientos que poseían la co - inoculación con HMA. Por otra parte se ha descrito que *P. fluorescens* es capaz de producir enzimas que suavizan la corteza radical, facilitando el ingreso del micelio micorrícico y aumentando

el grado de colonización. Esta especie bacteriana produce una serie de metabolitos que estimulan la esporulación de HMA, influenciando tanto el crecimiento del micelio como la reproducción de hongos micorrícicos (Linderman 1992; Muthula, *et al.*, 2010; Smith y Read, 2007). Aunque no se observó que la infección de *Meloidogyne* afecte a la cantidad registrada de esporas producidas, si se encontraron efectos negativos en cuanto al porcentaje de colonización, mostrando que los nematodos fitoparásitos redujeron la colonización micorrícica de forma considerable en todos los tratamientos. Varios autores que confirman este resultado (Siddiqui y Mahmood, 1997, Siddiqui y Mahmood, 2001; Siddiqui *et al.*, 2005) sugieren que en este fenómeno, los nematodos infectan raíces y producen el ensanchamiento del tejido radical, con la formación de los nódulos que impedirían que se produzca la colonización micorrícica.

4.4 Evaluación de la población de *P. fluorescens*

Tanto la micorrización como la infección de nematodos estimularon la reproducción bacteriana. Las raíces de las plantas inoculadas con los tres microorganismos poseían las poblaciones más elevadas de UFC por gramo de raíz, siendo la cepa 1 (Z3P1) la de mayor crecimiento. La micorrizósfera provee de un ambiente propicio para la proliferación de esta especie bacteriana, a través de la producción de ácidos orgánicos volátiles, fijación de nitrógeno y solubilización de fósforo, comprobando los beneficios que aporta la interacción de HMA y bacterias promotoras de la micorrización (Linderman, 1992).

5 RECOMENDACIONES

Se recomienda el desarrollo de ensayos (en condiciones controladas de invernadero) con mayor número de repeticiones, para determinar los efectos en el crecimiento y la producción en plantas de tomate de árbol tratadas con la combinación de microorganismos benéficos e infectados de *Meloidogyne*. Adicionalmente se sugiere determinar las especies de *Meloidogyne* que atacan al tomate de árbol, para realizar ensayos específicos de control biológico.

Se deberían utilizar diferentes mezclas de sustratos para evaluar la influencia del suelo sobre la interacción de los microorganismos benéficos en el desarrollo vegetal, como en la infección y la reproducción de *Meloidogyne*. El análisis de la concentración de nutrientes en las plantas y sustrato permitiría evaluar cómo afectan estos microorganismos a la absorción de nutrientes por parte de las plantas.

REFERENCIAS

1. Atlas. R. y Bartha R (2001) Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental. Person Education, España. pp: 101-106.
2. Herrera-Peraza R., Furrázola E, Ferrer R., Fernández R. y Torres Y. (2004). Functional strategies of root hairs and arbuscular mycorrhizae in an evergreen tropical forest, Sierra del Rosario. Cuba. Revista CENIC. Ciencias Biológicas. 35: 113-123.
3. León J., Viteri P. y Cevallos G. (2004). Manual del cultivo de tomate de árbol. Estación Experimental Santa Catalina - Programa de Fruticultura Granja Experimental Tumbaco. Quito – Ecuador.
4. Linderman L. (1992). VA Mycorrhizae and Microbial Interactions. VA Mycorrhizae in Sustainable Agriculture

5. Lorck H. (1948). Production of hydrocyanic acid by bacteria. *Physiologia Plantarum* 1: 142-146.
6. MAGAP, Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca (2011). Análisis Sectorial Ecuador. En línea:
http://www.magap.gob.ec/sinagap/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&itemid=414.
7. Mahmood I., Shafi A. y Rizvi R. (2011). Interaction between *Pseudomonas fluorescens* and *Meloidogyne incognita* on Tomato Plant as Influenced by the Different Levels of Phosphorus. *Archives of Phytopathology And Plant Protection*. pp: 993 – 1000.
8. Mandigan M., Martinko J. y Parker J. (2003). Brock: Biología de los microorganismos, 10ma. edición. Prentice Hall.
9. Moens M., Perry R. y Starr J. (2001). *Meloidogyne* Species – a Diverse Group of Novel and Important Plant Parasites Root- Knot Nematodes. Cab International. USA. pp: 1-13.
10. Muthula M., Devrajan K. y Jonathan E. (2010). Biocontrol of Root Knot Nematode, *Meloidogyne incognita* (kofoid and white) chitwood in Mulberry (*Morus alba* L.). *Journal of Biopesticides*. pp: 479 – 482. En línea: http://www.jbiopest.com/users/lw8/efiles/muthulaxmi_v32.pdf.
11. Phillips J. y Hayman D. (1970). Improved procedures for clearing roots and taining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55: 158-161.
12. Siddiqi M., (2000) *Tylenchida: Parasites of Plants and Insects*. 2da edición. Cabi Publications.
13. Siddiqui I., Haas d. y Heeb S. (2005) Extracellular Protease of *Pseudomonas fluorescens* CHA0, a Biocontrol Factor with Activity against the Root-Knot Nematode *Meloidogyne incognita*. *Applied and Enviromental Microbiology*.
14. Siddiqui I., Shaukat S., Sheikh I. y Khan A. (2006). Role of cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in the suppression of root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* in tomato. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 22: 641–650.
15. Siddiqui Z. y Mahmood I. (1997). Interaction of *Meloidogyne javanica*, *Fusarium solani* and Plant Symbionts on Chickpea. *Thai Journal of Agricultural Science*. pp: 379-388.
16. Siddiqui Z. y Mahmood I. (2001). Effects of rhizobacteria and root symbionts on the reproduction of *Meloidogyne javanica* and growth of chickpea. *Bioresource Technology*. 79: 41–45.
17. Smith J. y Collins H. (2007). *Management of Organisms and Their Processes in Soils Soil microbiology and biochemistry*. Elsevier. pp: 488-492.
18. Smith S. y Read, D. (1997). *Mycorrhizal Symbiosis*, 2da edición. Academic Press. Londres.
19. Zuckerman B., Mal W. y Harrison M. (eds) (1985). *Fitonematología: Manual de Laboratorio*. Centro Agronómico Tropical de Investigaciones y Enseñanza (CATIE).
20. Phillips J. y Hayman D. (1970). Improved procedures for clearing roots and taining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid.